第26卷 第1期　　昆虫学报　　Vol. 26, No. 1
1983年2月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Feb., 1983

O-乙基O-苯基S-(β-乙氧基)乙基硫代磷酸酯的旋光异构体生物活性的立体特异性

尚稚珍 张壬午 邹永华 王银淑 吴玉霞 李 英 于维强 唐除痴
(南开大学元素有机化学研究所)

在有机磷杀虫剂中，当磷原子上所连接的三个基团互不相同时，磷原子具有不对称性，存在着旋光异构体。近年来的研究表明（大川秀郎，1976；Fukuto，1979；Ohkawa等，1976、1978；Nomeir，1979；Yoshikawa，1980），这些旋光异构体在酶系反应、生物活性、对哺乳动物的毒性以及在生物体内的代谢等许多方面都有明显的差别。这种立体特异性涉及到对具有生理活性的有机磷化合物的作用机制及其它性质的阐明。同时，如果使用高效低毒的旋光异构体作为杀虫剂，避免使用消旋体，肯定可以提高药效，减少对环境的污染和其它有害作用。所以有机磷杀虫剂旋光异构体的立体特异性研究具有理论与实用意义。

我们在研究O-乙基O-取代苯基硫（醇）代磷酸酯类杀虫剂的结构与活性关系时（南开大学元素有机化学研究所，1978），发现O-乙基O-苯基S-(β-乙氧基)乙基硫代磷酸酯（简称4251）在室内及田间小区均具较强的触杀作用和良好的内吸作用。杀虫谱广，特别对水稻二化螟及三化螟效果突出，但毒性稍高。4251磷原子上的三个基团互不相同，因而也存在旋光异构体。我们用拆分的4251进行各种生物试验和酶系反应表明，4251的旋光异构体在对二化螟幼虫（*Chilo supperssalis*）、玉米螟（*Ostrinia furnacalis*）、蚊幼虫（*Culex pipiens*）、家蝇（*Musca domestica*）等昆虫的毒力，体内外酶系反应，温血动物毒性以及对植物的内吸活性方面都有明显差别，也存在立体特异性。本文将概述这些试验结果。

材 料 与 方 法

1. O-乙基O-苯基S-(β-乙氧基)乙基硫代磷酸酯（4251）其化学结构式为

$$\begin{array}{c} C_2H_5O \quad\quad O \\ \diagdown P \diagup\!\!\!\diagup \\ C_6H_5O \diagup \quad \diagdown SCH_2CH_2OC_2H_5 \end{array}$$

消旋体（±4251）的合成按南开大学元素有机化学研究所（1978）的方法，左旋体及

本文于1981年11月收到。
中国农科院植保所提供玉米螟虫源；天津市卫生防疫站代为测定对蚊幼虫的毒力；中国科学院动物研究所药剂毒理室代为测定家蝇毒力，在此一并致谢。

右旋体的合成和拆分按唐除痴等（1981）的方法。旋光异构体的绝对构型经化学相关法及X-射线衍射法确定（+）—4251为S构型，（—）—4251为R构型（唐除痴等，1981），旋光纯度（—）—4251为100%，（+）—4251为90%以上（唐除痴等，1981）。由于旋光度数较小，测量过程带来一些误差，使测得4251的旋光纯度偏低。

2. 二化螟的毒力测定方法　室内采用水稻种苗法及人工半合成饲料饲养法累代饲养的二化螟各龄幼虫作为试材（尚稚珍等，1979）。初孵蚁螟(1龄幼虫)以滤纸药膜法(南开大学元素有机化学研究所，1978）测定LT_{50}，每次重复3份，每份接虫20—30头，完全参加反应。3龄幼虫及6龄幼虫每个幼虫前胸背板上滴加药量为0.5—1微升，各浓度处理30头虫测定LD_{50}。

3. 水稻内吸作用测定方法　在温室内以营养液培养的稻苗，用管测法及盆栽法，施药于根部，内吸一定时间，分别接虫，以活虫率校正杀虫效果（南开大学元素有机化学研究所，1978）。

4. 胆碱酯酶的测定方法　根据 Ellman（1961）提出的乙酰硫代胆碱-二硫双硝基苯甲酸法(简称 Asch-DTNB 法)加以改进（张壬午等，1980)，测定胆碱酯酶的活力。而二化螟作为酶源时，则用6龄幼虫整体或头部匀浆，制备后及时应用；马血清，人血清及小白鼠脑匀浆分别制备，均以乙酰硫代胆碱作基质，以DTNB作显色剂，在离体条件下以试管法，在特定的反应系统中进行测定，于412毫微米波长处测定光密度。用概率值分析法计算I_{50}及PI_{50}，要求γ大于0.96，每次测定重复3次，误差小于±5%。

5. 小白鼠急性毒性实验　按5个不同剂量经口服给药，一周后以动物死亡数按寇氏法计算LD_{50}。

试验结果及分析

1. 4251旋光异构体对二化螟幼虫的毒力比较

(1) 对1龄幼虫的触杀毒力　以滤纸爬行法试验，从表1结果可以看出（+）—4251及(—)—4251二者对蚁螟击倒速度不同，(+)体与(±)体接近，仅3—4分钟而快于(—)体，其LT_{50}则（+）体比（—）体快1.65—1.84倍。

表1　4251旋光异构体对二化螟蚁螟的触杀作用

药　样	击倒时间（′分,″秒）			LT_{50}（′分″秒）	
	最　快	最　慢	加权平均值	田间虫源	室内虫源
(+)—4251	2′40″	5′24″	3′32″	4′18″	4′00″
(±)—4251	3′00″	6′28″	4′32″	5′14″	4′14″
(—)—4251	8′24″	13′12″	11′00″	12′00″	9′32″

(2) 对3龄及6龄幼虫的触杀力　3龄幼虫对（+)体敏感，(+)体与(—)体相差6倍。6龄幼虫（+）体大于（—）体9倍左右，而（±）体介于二者之间，且与（+）体接近(见表2)。由此可见4251对二化螟不同龄期，其异构体毒力表现的差别程度随龄期而增长。但总的规律均为（+）体毒力最强。这与EPN及稻丰散等农药的旋光异构体对二化螟的规律是相似的(大川秀郎，1976；Ohkawa，1977)。

表 2 4251 旋光异构体对二化螟3龄及 6 龄幼虫触杀毒力

药 样	龄期	LD50			毒力比值	备 注
		微克/虫	平均值	微克/克		
(+)—4251	3龄	0.0422 0.0425	0.0424	1.060	6.1792	平均体重为 40 毫克，每虫滴加药量 0.5 微升
(±)—4251		0.0445 0.0576	0.0511	1.278	5.1271	
(−)—4251		0.2501 0.2739	0.2620	6.550	1.000	
(+)—4251	6龄	0.2966 0.2426	0.2629	3.3700	9.2519	平均体重 80 毫克,每虫滴加药量 0.5—1 微升
(±)—4251		0.3177 0.2505	0.2841	3.5513	8.7445	
(−)—4251		2.6740 2.3145	2.4943	31.1787	1.000	

2. 4251 旋光异构体对二化螟胆碱酯酶活力的抑制作用

我们以 Asch-DTNB 法测定了二化螟胆碱酯酶活力的反应条件为：在 27℃ 温浴中，pH 7.4 缓冲液和 15 分钟反应时间。将 4251 异构体分别以不同浓度点滴于二化螟 6 龄幼虫前胸背板上，每虫滴加药量 1 微升，20 分钟后，用丙酮清洗体表，取一定数量 6 龄幼虫(或头部)匀浆作为酶源，结果表明 4251 旋光异构体对胆碱酯酶活力的影响与中毒症状及其触杀毒力是一致的。从表 3 可以看出，(+)体比(−)体 I_{50} 高达 14 倍(整体匀浆)，而头部胆碱酯酶活力相差 6.7 倍。与毒力测定 LD_{50} 二者相差 9 倍是相平行的。

表 3 4251 旋光异构体对二化螟胆碱酯酶的抑制作用（体内）

药 样	幼 虫 （整体）			幼 虫 （头部）		
	I_{50}	PI_{50}	毒力比值	I_{50}	PI_{50}	毒力比值
(+)—4251	9.80×10^{-4}	3.01	14.80	4.85×10^{-4}	3.31	6.74
(±)—4251	1.06×10^{-3}	2.97	13.02	6.71×10^{-4}	3.17	4.87
(−)—4251	1.38×10^{-2}	1.87	1.00	3.27×10^{-3}	2.48	1.00

值得注意的是以二化螟作酶源，若直接在体外(不通过虫体)加入不同旋光异构体，所得结果刚好和体内所得结果相反(表 4)。

表 4 4251 旋光异构体对二化螟胆碱酯酶的抑制作用（体外）

药 样	幼 虫 （整体）			幼 虫 （头部）		
	I_{50}	PI_{50}	毒力比值	I_{50}	PI_{50}	毒力比值
(+)—4251	1.78×10^{-5}	4.75	1.00	1.99×10^{-5}	4.70	1.00
(±)—4251	7.94×10^{-6}	5.10	2.24	7.08×10^{-6}	5.15	2.81
(−)—4251	2.28×10^{-6}	5.64	7.81	2.82×10^{-6}	5.55	7.06

结果是(−)体抑制力强于(+)体，相差 7.8 倍(整体匀浆)和 7.1 倍（头部匀浆)，离体条件下，(−)体表现出较大的抑制二化螟胆碱酯酶的活力。

3. 4251 旋光异构体对哺乳动物胆碱酯酶活力的影响

为了明确 4251 旋光异构体对高等动物酶系的规律，测定了马血清 CHE，人血清 CHE 和小鼠脑匀浆 CHE 的 I_{50}（或 PI_{50}）结果见表 5。

表 5 4251 旋光异构体对哺乳动物胆碱酯酶（CHE）活力的影响

药样	小鼠脑匀浆			人血清			马血清		
	I_{50}	PI_{50}	毒力比值	I_{50}	PI_{50}	毒力比值	I_{50}	PI_{50}	毒力比值
(+)—4251	4.88×10^{-5}	4.31	1.00	7.5×10^{-8}	7.12	7.67	5.01×10^{-7}	6.30	1.26
(±)—4251	9.96×10^{-6}	5.00	4.89	1.35×10^{-7}	6.87	4.26	4.52×10^{-7}	6.34	1.14
(−)—4251	8.25×10^{-6}	5.08	5.92	5.75×10^{-7}	6.24	1.00	3.98×10^{-7}	6.40	1.00

以上数据反映出不同酶源与 4251 不同旋光异构体表现出不同结果。三种 CHE 被抑制的结果有很大差别，而且(+)体与(−)体强弱规律也不一致。小白鼠脑匀浆是(+)体低于(−)体约 6 倍；马血清 CHE 二者则相差不多；而人血清 CHE (+) 体高于 (−) 体约 7 倍左右。(±)消旋体的活性，无论对昆虫或动物的酶系，始终介于(+)与(−)体之间而接近于活性高的一方。

4. 4251 旋光异构体对高等动物的毒性

消旋体对高等动物毒性较高，小白鼠 LD_{50} 口服急性毒性为 58 毫克/公斤（南开大学元素有机化学研究所，1978），测定结果如表 6 所示：(−) 体毒性高，(±) 体与之相近，(+)体则低于(−)体 3 倍多。(−)—4251 对小白鼠 CHE 活力的抑制作用比 (+) 体强，故口服急性中毒与之完全相符。

表 6 4251 旋光异构体对高等动物的急性毒性

药样	LD_{50} 毫克/公斤	相对毒性	备注
(+)—4251	124.45	3.386	小白鼠雌雄各半。
(±)—4251	47.67	1.298	
(−)—4251	36.73	1.000	

5. 4251 旋光异构体对其它昆虫的毒力比较

我们测定了 4251 异构体对玉米螟、蚊幼虫及家蝇成虫的毒力。从表 7 与表 8 可见对玉米螟的 1 龄、3 龄、6 龄幼虫与二化螟测试结果基本相同，差异程度的幅度略大，立体特异性表现明显。

表 7 4251 旋光异构体对玉米螟蚊螟的触杀作用（滤纸爬行法）

药样	击倒时间（分）		
	最快	最慢	加权平均值
(+)—4251	7.0	12.33	9.23
(±)—4251	9.67	15.6	12.22
(−)—4251	11.67	45.00	37.23

1 龄幼虫(+)体比(−)体触杀速度快 4 倍，3 龄幼虫(+)体比(−)体高 12 倍，6 龄高 9 倍。玉米螟与二化螟同属螟蛾科，毒力相差不多，均为(+)体活力强。

对蚊幼虫以浸液法测得结果以及对家蝇成虫以击倒中时 (KT_{50}) 作比较（见表 9），仍然是(+)体活力较强。

表8 4251旋光异构体对玉米螟幼虫的触杀毒力

药样	幼虫	LD_{50} 微克/虫	平均值	微克/克	毒力比值	备注
(+)—4251	3龄	0.0251 0.0321	0.0286	0.572	12.045	平均体重为50毫克，每虫滴药0.5微升
(±)—4251		0.0441 0.0380	0.0411	0.822	8.382	
(−)—4251		0.3013 0.3876	0.3445	6.890	1.000	
(+)—4251	6龄	0.5012 0.5781	0.5397	5.397	9.792	平均体重为100毫克，每虫滴药1微升
(±)—4251		0.6310 0.6486	0.6396	6.396	8.263	
(−)—4251		5.370 5.020	5.285	52.850	1.000	

表9 4251旋光异构体对蚊幼虫的 LC_{50} 及对家蝇成虫的 KT_{50}

药样	蚊幼虫		家蝇（感性品系）	
	LC_{50}(ppm)	毒力比值	KT_{50}（分）	毒力比值
(+)—4251	0.250	5.200	7	2.0
(±)—4251	0.305	4.262	7.7	1.7
(−)—4251	1.300	1.000	13.1	1.0

6. 4251旋光异构体在植物体内吸后对二化螟的毒效

由于4251施于水层中表现良好的防枯鞘或防枯心及保穗作用，而且至少维持10—15天的残效，表明具有内吸作用。从表10结果可看出，不同异构体经水稻根部内吸传导至茎叶部，其杀虫效果随浓度降低而递减。以一个浓度0.375ppm来比较，(+)体与(−)体间显然差别悬殊，杀虫效果(+)体为88.7%，而(−)体仅11.8%，仍以(+)体活力强。作为内吸性杀虫剂，(+)体比消旋体也要优异。就物化性质而言，两种异构体间可能没有

表10 4251旋光异构体对二化螟内吸作用（管测法）

药样	浓度（ppm）	活虫率（%）	杀虫效果（%）
(+)—4251	0.75	0	100
	0.375	10	88.7
	0.1875	22.2	73.8
	0.0937	50	41.2
(±)—4251	0.75	0	100
	0.375	35.0	58.8
	0.1875	45.0	47.1
	0.0937	70.0	17.6
(−)—4251	1.50	42.5	50
	0.75	57.5	32.4
	0.375	75.0	11.8
对照	—	85.0	—

多大差别。(＋)体作用强可能还是对乙酰胆碱酯酶抑制作用强造成的。

讨论与小结

从上述结果可以看出，4251 旋光异构体与生物系统起作用时，表现了立体特异性，在几种害虫的酶系，植物内吸及动物毒性方面都得到了证明。4251 旋光异构体对二化螟、玉米螟、蚊、蝇等不同种类的害虫及对二化螟的内吸活性，都是(＋)体具有较强的毒力，各异构体间的毒力差别程度虽随供试对象的不同各异，但总是(＋)体高于(－)体，(±)体介于二者之间。

4251 旋光异构体对酶系反应虽然表现了明显的立体特异性，但随酶源的变化而差异较大。对人血清 CHE (即假胆碱酯酶 BUCHE) 的抑制，(＋)体大于(－)体，而对小白鼠脑 CHE (即真胆碱酯酶 ACHE) 恰好相反，(－)体大于(＋)体，但这和对小白鼠口服急性毒性试验的结果是一致的。

值得注意的是，4251 旋光异构体对二化螟 CHE 的抑制，当药剂通过虫体时所表现的抑制作用是 (＋) 体比 (－) 体高 6—14 倍，这和对二化螟幼虫的毒力试验是一致的。但当采用离体的二化螟 CHE 时得到恰恰相反的结果，即(－)体比(＋)体抑制活性高 7—8 倍。这种差别说明，4251 的两种异构体在虫体内的吸收、传导、转化代谢也存在着立体特异性，从而表现在到达作用点后感受性产生了明显的差别。深入研究这些问题可能会有助于更好地说明有机磷杀虫剂的作用机制。

在对二化螟、玉米螟等害虫杀虫活性方面，4251(＋) 体药效高，经水稻根部内吸杀虫性强，而对哺乳动物口服毒性方面刚好是(＋)体毒性低于(－)体，在(＋)体上集中了高效低毒的优点。我们准备进一步研究以便提供更理想具实用价值的农药新品种。

参 考 文 献

南开大学元素有机化学研究所 1978 O-乙基 O-取代苯基硫(醇)代磷酸酯类杀虫剂的研究。农药工业(3): 1—10。

尚稚珍、王银淑、邹永华 1979 二化螟饲养方法的研究。昆虫学报 **22**(2): 164—7。

张壬午、王世华 1980 有机磷酸酯类化学结构与抑制胆碱酯酶活力关系的研究。农药工业(4): 8—10。

唐除痴、吴桂萍、柴有新 1981 O-乙基 O-苯基硫代磷酸的拆分及其手征性硫(醇)代酯的合成。高等学校化学学报 **2**(1): 70—6。

大川秀郎 1976 有机隣リン光学異構体の合成と生理作用。日本农药学会誌 **1**(4): 325—34。

Ellman, C. L.; K. D. Courtney, V. Anders Jr. and R. M. Featherstone 1961 A new and rapid colorimetric determination of acetycholinesterase activity. *Biochem. Pharm* **7**: 88—93.

Fukuto, T. R. 1979 Effect of structure on the interaction of organophorus and carbamate esters with acetylcholinesterase, neurotoxicology of pesticide and pheromones. 1979 Plenum Press, New York.

Ohkawa, H., N. Mikami, K. Kasamatesu and J. Miyamoto 1976 Stereoselectivity in toxicity and acetylcholinesterase inhibition by the optical isomers of Papthion and Papoxin. *Agric. Biol. Chem.* **40**(9): 1857—61.

Ohkawa, H., N. Mikami and J. Miyamoto 1978 Metabolism of the optical isomers of Cyanofenphos in rice stem borer larrae. *Agric. Biol. Chem.* **42**(4): 445—50.

Nomeir, A. A. and W. C. Dauterman 1979 Studies on the optical isomers of EPN and EPNO. *Pest Biochem. Physiol.* **10**(2): 121—70.

Yoshikawa, H., M. Yasuda, A. Hirashima, K. Oshima and M. Eto 1980 Synthesis and insecticidal activity of some new optically active phenylphosphonothiolates and thionates. *Agric. Biol. Chem.* **44**(6): 1447—9.

STEREOSPECIFICITY IN BIOLOGICAL ACTIVITIES OF THE OPTICAL ISOMERS OF O-ETHYL O-PHENYL S-(2-ETHYLOXY) ETHYL PHOSPHOROTHIOATE (4251)

SHANG CHIH-CHEH ZHANG REN-WU ZHOU YONG-HAU WANG YIH-SHU
UU YU-XIA LI YING YU FEI-QIANG AND TANG CHU-CHI

(The Institute of Elemento-Organic Chemistry Nankai University, Tianjin)

This report concerns the differential toxicity of the optical isomers of 4251 towards different insects. The (+)-isomer of 4251 is more effective as an insecticide to rice stem borer (*Chilo supperssalis*) larvae, corn borer (*Ostrinia furnacalis*) larvae, houseflies (*Musca domestica*) adults, and mosquito (*Culex pipiens*) larvae than the (−)-isomer. The (+)-isomer is 6-to 9-fold more toxic to rice stem borer larvae and 9-to 14-fold more toxic to corn borer than its enantiomer. Also, the three forms of 4251 showed a marked difference in toxicity to rice plants through systemic activity.

The different results of stereospecificty in cholinesterase inhibitions of the optical isomers of 4251 to the cholinesterases of rice stem borer larvae, human serum, horse serum and mouse brains were also obtained. It is interesting to note that the inhibition of the (−)-isomer to rice stem borer CHE in vitro is 7-to 8-fold more than that of the (+)-isomer. In contrast, if the insects were treated with the drug in advance, I_{50} of the (+)-isomer is 7-to 14-fold more than that of the (−)-isomer. It is apparent that the (−)-isomer has rather high mammlian toxicity.

The activity of the racemic compound was close to the mean of the two resolved isomers or close to that of the stronger one. Therefore the (+)-isomer of 4251 appears to be a more appropriate insecticide than the racemic compound, since its property combines high toxicity to insects and low mammalian toxicity.